

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-189848

(43)Date of publication of application : 08.07.2003

(51)Int.Cl. C12N 5/06

(21)Application number : 2002-298832

(71)Applicant : SANYO CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 11.10.2002

(72)Inventor : OSUMI TATSUYA

(30)Priority

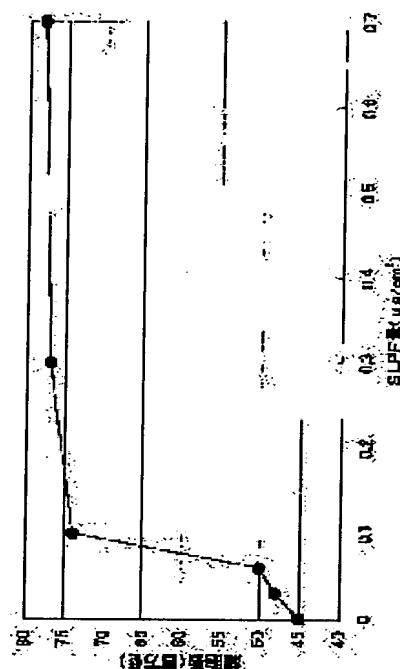
Priority number : 2001322356 Priority date : 19.10.2001 Priority country : JP

(54) BEAD FOR CULTURING ANIMAL CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide beads which are used for culturing animal cells, have a high animal cell-adhering property and a high animal cell-proliferating property, and can efficiently culture the animal cells even in a serum-free culture medium.

SOLUTION: The beads for culturing the animal cells are characterized by disposing a polypeptide (P) having at least one minimum amino acid sequence exhibiting a cell adhesion signal in one molecule on the surfaces of fine particles (B), wherein the content of (P) is 0.1 to 100 μg per cm^2 of the surfaces of (B). The volume-average particle diameter of (B) is preferably 50 to 250 μm . The true specific gravity (density) of (B) is preferably 1.01 to 1.05 (g/cm^3). (B) preferably comprises at least styrene units and multifunctional monomer units as constitutional units. The polypeptide (P) preferably has three to fifty minimum cell adhesion signal-exhibiting amino acid sequences in the molecule.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 27.05.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-189848
(P2003-189848A)

(43) 公開日 平成15年7月8日 (2003.7.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/06	Z N A	C 1 2 N 5/00	Z N A E 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2002-298832(P2002-298832)
(22) 出願日 平成14年10月11日 (2002. 10. 11)
(31) 優先権主張番号 特願2001-322356(P2001-322356)
(32) 優先日 平成13年10月19日 (2001. 10. 19)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

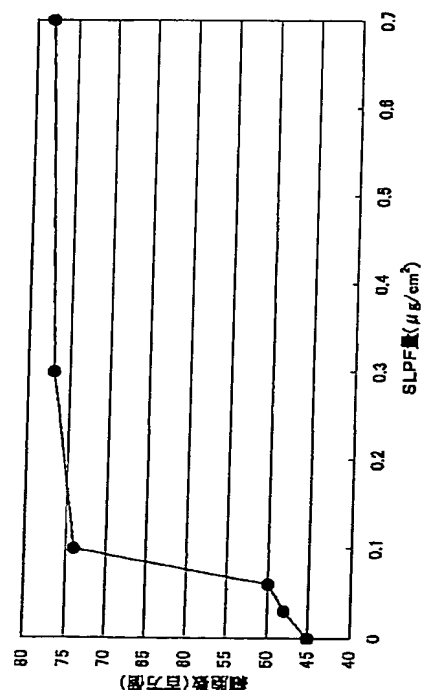
(71) 出願人 000002288
三洋化成工業株式会社
京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1
(72) 発明者 大隅 辰也
京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋
化成工業株式会社内
Fターム(参考) 4B065 AA90X BC41 BD50 CA60

(54) 【発明の名称】 動物細胞培養用ビーズ

(57) 【要約】

【課題】 動物細胞の接着性及び増殖性が高く、特に無血清培地でも効率的に培養できる動物細胞培養用ビーズを提供すること。

【解決手段】 微粒子 (B) の表面に、細胞接着シグナルを現す最小アミノ酸配列を1分子中に少なくとも1個有するポリペプチド (P) を配してなり、(P) の含有量が (B) の表面積 1 cm^2 当り $0.1\sim 100\text{ }\mu\text{g}$ であることを特徴とする動物細胞培養用ビーズを用いる。なお、(B) の体積平均粒子径は $50\sim 250\text{ }\mu\text{m}$ が好ましい。また、(B) の真比重は $1.01\sim 1.05\text{ g/cm}^3$ が好ましい。また、(B) は少なくともスチレン及び多官能性モノマーを構成単位としてなることが好ましい。また、ポリペプチド (P) の細胞接着シグナルを現す最小アミノ酸配列の数は、(P) 1分子中に $3\sim 50$ 個が好ましい。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 微粒子(B)の表面に、細胞接着シグナルを現す最小アミノ酸配列を1分子中に少なくとも1個有するポリペプチド(P)を配してなり、(P)の含有量が(B)の表面積1cm²当り0.1~100μgであることを特徴とする動物細胞培養用ビーズ。

【請求項2】 体積平均粒子径が50~250μmである請求項1記載のビーズ。

【請求項3】 真比重が1.01~1.05g/cm³である請求項1又は2記載のビーズ。

【請求項4】 微粒子(B)が少なくともスチレン及び多官能性モノマーを構成単位としてなる請求項1~3のいずれか記載のビーズ。

【請求項5】 ポリペプチド(P)の細胞接着シグナルを現す最小アミノ酸配列の数が、(P)1分子中に3~50個である請求項1~4のいずれか記載のビーズ。

【請求項6】 ポリペプチド(P)の細胞接着シグナルを現す最小アミノ酸配列が、アミノ酸3文字表記で現われる、Arg Gly Asp配列、Leu Asp Val配列、Arg Glu Asp Val配列(1)、Tyr Ile Gly Ser Arg配列(2)、Pro Asp Ser Gly Arg配列(3)、Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg配列(4)、Leu Gly Thr Ile Pro Gly配列

(5)、Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile配列(6)、Ile Lys Val Ala Val配列(7)、Leu Arg Glu配列、Asp Gly Glu Ala配列(8)及びHis Ala Val配列からなる群より選ばれる少なくとも1種の配列である請求項1~5のいずれか記載のビーズ。

【請求項7】 ポリペプチド(P)が、さらにアミノ酸3文字表記で現されるGly Ala Gly Ala Gly Ser配列(9)を少なくとも2個有してなる請求項1~6のいずれか記載のビーズ。

【請求項8】 無血清培地を用いて、請求項1~7のいずれか記載のビーズ上で動物細胞を培養することを特徴とする動物細胞の生産方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、動物細胞培養用ビーズに関する。さらに詳しくは、細胞の接着・増殖性が高く、特に、無血清培地を用いても、血清含有培地と同等以上の接着・増殖性を与える動物細胞培養用ビーズに関するものである。

【0002】

【従来の技術】アミノ酸3文字表記で現されるArg Gly Asp配列を有する遺伝子組換えペプチドであるプロネクチンF(以下、PnFと略する。)やポリ-L-リジンコートした樹脂ビーズに対する細胞接着性を、0.5%の血清を含有した培地を使用して研究発表されている(非特許文献1)。

【0003】

【非特許文献1】バラニ(J.Varani),インマン(D.R.I

nman),フリギール(S.E.G.Fligiel),ヒリガス(W.J.Hillegas)、サイトテクノロジー(Cytotechnology)13,1993年、89-98頁

【0004】

【発明が解決しようとする課題】この研究発表において、PnFを0.005μg/cm²あるいは0.025μg/cm²コートした場合、コートしない場合のそれぞれ3倍又は5倍の細胞接着性を示すが、接着・増殖性がさらに高いものが強く要望されている。一方、同研究発表で、ポリ-L-リジンを0.5μg/cm²コートした場合に、コートしない場合の約41倍の細胞接着性を示すが、この場合、細胞の伸張が遅いという問題と、ポリ-L-リジンには毒性があるという問題がある。すなわち、本発明の目的は、動物細胞の接着性及び増殖性が高く、特に無血清培地でも効率的に培養できる動物細胞培養用ビーズを提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、鋭意研究を重ね、特定のポリペプチドを0.1μg/cm²以上でコートした樹脂ビーズを用いることにより劇的に細胞接着性及び増殖性が高くなることを見だし本発明に到達した。すなわち、本発明の動物細胞培養用ビーズの特徴は、微粒子(B)の表面に、細胞接着シグナルを現す最小アミノ酸配列を1分子中に少なくとも1個有するポリペプチド(P)を配してなり、(P)の含有量が(B)の表面積1cm²当り0.1~100μgである点にある。

【0006】

【発明の実施の形態】まず、微粒子(B)について説明する。微粒子(B)は、水不溶性であればいかなる材質も使用可能であるが、成型性や細胞毒性が低いという点で好ましいものを列記すると、ビニル樹脂(ポリスチレン、ポリアクリルアミド架橋体(アクリルアミドとエチレングリコールジアクリレートとの共重合体等)、ポリメチル(メタ)アクリレート及びポリ(メタ)アクリロニトリル等)、ポリエステル、ポリウレタン、エポキシ樹脂、ナイロン及びポリカーボネート等の合成高分子を主成分とするもの、セルロース、セルロース誘導体(セルロースジアセテート及びセルローストリアセテート等)、架橋コラーゲン、架橋ゼラチン、架橋キチン及びデキストラン等の天然高分子を主成分とするもの、並びに酸化アルミニウム、ハイドロキシアパタイト、酸化チタン、シリカ及びガラス等の無機物を主成分とするもの等が挙げられる。なお、水不溶性とは、37℃の水(電気伝導度1ジーメンス未満のイオン交換水)に対する溶解度が1g/100g未満のものをいう。イオン交換水に対する溶解度は、次のようにして求められる。100gのイオン交換水(電気伝導度1ジーメンス未満)に、過剰の(B)を加え、37℃で24時間攪拌し完全に飽和させる。次に孔径10μmのメンブランフィルターで

ろ過して得られるろ液を100℃で蒸発させてその残渣を測定することにより求められる。

【0007】これらの中で、細胞との親和性が良いという点で、合成高分子を主成分とするもの、天然高分子を主成分とするもの及びハイドロキシアパタイトが好ましく、さらに好ましくは合成高分子を主成分とするもの及び天然高分子を主成分とするもの、特に好ましくは合成高分子を主成分とするもの、最も好ましくはビニル樹脂を主成分とするものである。ビニル樹脂としては、スチレン及び多官能性モノマーを構成単位としてなるポリスチレン、メチル（メタ）アクリレート及び多官能性モノマーを構成単位としてなるポリメチル（メタ）アクリレート、並びに（メタ）アクリルアミド及び多官能性モノマーを構成単位としてなるポリ（メタ）アクリルアミド等が挙げられ、これらの中で、スチレン及び多官能性モノマーを構成単位としてなるポリスチレンが望ましい。多官能性モノマーとしては、細胞毒性が低くスチレンと共重合しうるモノマーであれば制限なく使用でき、2～4官能のビニル化合物及び（メタ）アクリロイル化合物等が用いられ、例えば、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、トリビニルベンゼン及びトリメチロールプロパントリ（メタ）アクリレート等が挙げられる。

【0008】ビニル樹脂を主成分とする場合、ビニル樹脂（ポリスチレンが好ましい）中のビニルモノマー（スチレン、メチル（メタ）アクリレート及び（メタ）アクリルアミド等）単位の含有量は、微粒子（B）の重量に基づいて、60～99.9重量%が好ましく、さらに好ましくは80～99.5重量%、特に好ましくは90～99.9重量%である。すなわち、この場合、ビニル樹脂中のビニルモノマー単位の含有量（重量%）は、微粒子（B）の重量に基づいて、60以上が好ましく、さらに好ましくは80以上、特に好ましくは90以上であり、また99.9以下が好ましく、さらに好ましくは99.5以下、特に好ましくは99以下である。ビニル樹脂（ポリスチレンが好ましい）中の多官能性モノマー単位の含有量は、微粒子（B）の重量に基づいて、0.1～40重量%が好ましく、さらに好ましくは0.5～20重量%、特に好ましくは1～10重量%である。すなわち、多官能モノマー単位の含有量（重量%）は、微粒子（B）の重量に基づいて、0.1以上が好ましく、さらに好ましくは0.5以上、特に好ましくは1以上であり、また40以下が好ましく、さらに好ましくは20以下、特に好ましくは10以下である。

【0009】微粒子（B）の形態には中実型と多孔質型があるが、本発明においては特に制限はなく、中実型でも多孔質型でも使用できる。これらのうち、通常の培養方法でも細胞に対する栄養や酸素の供給が効率よく行え、細胞の回収率が高くできるという点において、中実型が好ましい。また、微粒子（B）の形状としては、細

胞が接着できる表面積が大きくなるという点で、針状、板状又は直方体状等は好ましくなく、すなわち球状が好ましく、特に真球状に近い方が好ましい。

【0010】微粒子（B）の形態が中実型の場合、

（B）の体積平均粒子径は、20～1000 μ mが好ましく、さらに好ましくは40～500 μ m、特に好ましくは50～250 μ mである。すなわち、この場合、

（B）の体積平均粒子径（ μ m）は、20以上が好ましく、さらに好ましくは40以上、特に好ましくは50以上であり、また1000以下が好ましく、さらに好ましくは500以下、特に好ましくは250以下である。体積平均粒子径がこの範囲内であると、細胞の接着のしやすさと単位体積当りの有効表面積のバランスが取れており、特に50～250 μ mの範囲であると、その傾向が顕著である。また、粒子径（ μ m）は、15～1500が好ましく、さらに好ましくは30～600、特に好ましくは40～300である。すなわち、粒子径（ μ m）は、15以上が好ましく、さらに好ましくは30以上、特に好ましくは40以上であり、また1500 μ m以下が好ましく、さらに好ましくは600 μ m以下、特に好ましくは300 μ m以下である。微粒子（B）の形態が多孔質型の場合、体積平均粒子径は、50～20000 μ mが好ましく、さらに好ましくは100～10000 μ m、特に好ましくは200～5000 μ mである。すなわち、この場合、体積平均粒子径（ μ m）は、50以上が好ましく、さらに好ましくは100以上、特に好ましくは200以上であり、また20000以下が好ましく、さらに好ましくは10000以下、特に好ましくは5000以下である。また、粒子径（ μ m）は、30～25000が好ましく、さらに好ましくは50～12000、特に好ましくは75～6000である。すなわち、粒子径（ μ m）は、30以上が好ましく、さらに好ましくは50以上、特に好ましくは75以上であり、また25000以下が好ましく、さらに好ましくは12000以下、特に好ましくは6000以下である。

【0011】形態が多孔質型の場合、気孔径は5～500 μ mが好ましく、さらに好ましくは7～100 μ m、特に好ましくは10～50 μ mである。すなわち、この場合、気孔径（ μ m）は5以上が好ましく、さらに好ましくは7以上、特に好ましくは10以上であり、また500以下が好ましく、さらに好ましくは100以下、特に好ましくは50以下である。なお、体積平均粒子径は、レーザー式粒度分布測定装置（例えば、商品名LA-920：堀場製作所製、商品名マルチタイザーIII：コールター社製等）で、水等を分散媒として用いて測定できる。また、気孔径は、電子顕微鏡で観察することで測定できる。

【0012】微粒子（B）の真比重は特に制限はないが、本発明のビーズの使用方法によって好ましい範囲が異なる。すなわち、ビーズを培地とともに攪拌しながら

細胞培養するいわゆる懸濁培養法等においては、攪拌中はビーズは浮遊し、攪拌を止めると沈降することが好ましく、微粒子(B)の真比重としては $1.00 \sim 1.10 \text{ g/cm}^3$ が好ましく、さらに好ましくは $1.01 \sim 1.08 \text{ g/cm}^3$ 、特に好ましくは $1.01 \sim 1.05 \text{ g/cm}^3$ である。すなわち、微粒子(B)の真比重(g/cm^3)としては、 1.00 以上が好ましく、さらに好ましくは 1.01 以上であり、また 1.10 以下が好ましく、さらに好ましくは 1.08 以下、特に好ましくは 1.05 以下である。

【0013】また、ビーズを流動層型バイオリアクター等の中に流動層として固定して培地を循環しながら細胞培養するいわゆる灌流培養等においては、ビーズが液流によって舞い上がらないことが好ましく、微粒子(B)の真比重としては $1.1 \sim 10.0 \text{ g/cm}^3$ が好ましく、さらに好ましくは $1.3 \sim 8.0 \text{ g/cm}^3$ 、特に好ましくは $1.5 \sim 3.0 \text{ g/cm}^3$ である。すなわち、微粒子(B)の真比重(g/cm^3)としては 1.1 以上が好ましく、さらに好ましくは 1.3 以上、特に好ましくは 1.5 以上であり、また 10.0 以下が好ましく、さらに好ましくは 8.0 以下、特に好ましくは 3.0 以下である。なお、灌流培養においても、ビーズをホローファイバー等に充填された状態で固定して培地を循環しながら培養する場合には、微粒子(B)の真比重は特に規定されない。

【0014】微粒子(B)の製造方法については特に制限はなく、従来から公知の方法等が適用できる。合成高分子を主成分とする場合、微粒子(B)の水性分散液を、例えば、①懸濁重合法又は乳化重合法で直接得るか、②バルク重合又は溶液重合後に転相乳化法又は貧溶媒添加法で得るかした後、(B)の水性分散液を遠心分離又はろ過により(B)を製造する方法や、③バルク重合又は溶液重合で得られた重合体(溶液)をスプレードライすることによって(B)を製造する方法(大津隆行、木下雅悦著「高分子化学合成の実験法」化学同人、1972年)等が挙げられる。なお、溶液重合品をスプレードライすることによって、多孔質型のビーズが得られる。

【0015】ビニル樹脂を主成分とする場合はいずれの方法も適用できるが、特にポリスチレンを効率良く合成できるという点で懸濁重合による方法が好ましい。例えば、ビニル樹脂であるスチレンと多官能モノマーからなるビーズは、ポリビニルアルコール[例えば、(株)クラレ製、商品名:PVA35P]を分散剤として用い(例えばモノマー全量に対して 0.4 重量%)、例えばスチレンとジビニルベンゼンの混合モノマー(例えばスチレン/ジビニルベンゼン=98/2重量比)を、例えばモノマー30重量部に対して70重量部の水に分散させ、重合開始剤[例えば、日本化薬(株)製ベンゾイルパーオキシド]を例えばモノマー全量に対して3重量%

加えた後、窒素雰囲気下で攪拌しながら 80°C で7時間反応後、ろ過、乾燥(例えば 80°C で10時間)、篩い分け(例えば、目開き $106 \mu\text{m}$ 金属製網篩(JIS Z8801-1987)を通り、目開き $75 \mu\text{m}$ 金属製網篩(JIS Z8801-1987)に残るもの選別)することによって、得られる。

【0016】ポリエステル、ポリウレタン、エポキシ樹脂、ナイロン及びポリカーボネートを主成分とする場合は、乳化重合による方法以外の方法が適用できるが、懸濁重合による方法および転相乳化による方法が好ましい。天然高分子を主成分とするものは、④その溶液を用いて転相乳化法又は貧溶媒添加法で水性分散体を得た後、これを遠心分離又はろ過により微粒子(B)を製造する方法や、⑤その溶液をスプレードライすることによって製造することができる。なお、スプレードライすることによって多孔質型のビーズが得られる。

【0017】無機化合物を主成分とするものは、市販品をそのまま又は篩い分けを行った後に使用できる。市販品としては、例えば、酸化アルミナとして昭和電工(株)製又は住友化学(株)製の活性アルミナ、ハイドロキシアパタイトとして富山製薬(株)製又は京セラ(株)製のハイドロキシアパタイト粉末、酸化チタンとして石原産業(株)製又はチタン工業(株)製の酸化チタン粉末、シリカとして東海化学(株)製のシリカ粉末、及びガラスとして日本板硝子(株)製のガラス粉末がそれぞれ挙げられる。

【0018】また、細胞培養用ビーズとして市販されているビーズも使用可能である。市販品としては、例えば、ポリスチレン製として、ナルジェヌンク社製の商品名バイオシロン(Biosilon)、ソロヒル社製の商品名プラスチックビーズ(Plastic beads)及びラックス社製の商品名サイトスフェア(Cytosphere)；ポリアクリルアミド製としてバイオラッド(株)製の商品名バイオキャリア(Biocarrier)；ポリウレタン製としてイノアック(株)製の商品名PUF；セルロース製としてバイオマテリアル(株)製の商品名セルスノウ(Cellsnow)；コラーゲン製としてベラックス社製の商品名ベラックス(Verax)；ゼラチン製として東洋紡績(株)製の商品名カルチスフェア(Cultispher)；デキストラン製としてアムシャムファルマシア社製の商品名サイトデックス(Cytode x)；並びにガラス製としてスコット社製の商品名シラン(SIRAN)等が挙げられる。

【0019】細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列を1分子中に少なくとも1個有するポリペプチド

(P)について説明する。細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列としては、接着シグナルとして働くものであればいずれも使用でき、例えば、株式会社永井出版発行「病態生理」Vol. 9、No. 7(1990)527頁に記載されているもの等が使用できる。

【0020】これらのうち、接着する細胞の種類が多いという点で、Arg Gly Asp配列、Leu Asp Val配列、Arg G

lu Asp Val配列(1)、Tyr Ile Gly Ser Arg配列(2)、Pro Asp Ser Gly Arg配列(3)、Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg配列(4)、Leu Gly Thr Ile Pro Gly配列(5)、Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile配列(6)、Ile Lys Val Ala Val配列(7)、Leu Arg Glu配列、Asp Gly Glu Ala配列(8)及びHis Ala Val配列からなる群から選ばれる少なくとも1種の配列が好ましく、さらに好ましくはArg Gly Asp配列、Ile Lys Val Ala Val配列(7)及びHis Ala Val配列からなる群から選ばれる少なくとも1種の配列である。なお、アミノ酸配列はアミノ酸3文字表記で現わし、()内にアミノ酸配列表に対応する配列番号を付記した。

【0021】ポリペプチド(P)中には前記最小アミノ酸配列が1分子中に少なくとも1個含有される必要がある。前記最小アミノ酸配列があると、細胞接着活性が高まり、本来の機能を維持した状態で動物細胞の増殖を促進することが可能となる。一方、前記最小アミノ酸配列が含有されない場合、細胞接着性が低下する結果、特に無血清培地を用いる場合に細胞の増殖が不十分になる。

【0022】この最小アミノ酸配列の含有量は、細胞接着・増殖性の観点から、1分子中3～50個が好ましく、さらに好ましくは5～40個、特に好ましくは10～30個である。含有量がこの範囲であると、細胞接着活性がさらに高まり、本来の機能を維持した状態で動物細胞の増殖を促進することが容易となりやすい傾向にある。

【0023】ポリペプチド(P)の数平均分子量(M_n)は、細胞に対する毒性が低く、接着性能が高いという点で、5,000～5,000,000が好ましく、さらに好ましくは10,000～1,000,000、特に好ましくは50,000～500,000である。なお、ポリペプチド(P)の数平均分子量(M_n)は、SDS-PAGE法(Naドデシルスルフェート-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法)で、(P)を水中で展開し、泳動距離を標準物質と比較することによって求められる。

【0024】ポリペプチド(P)は、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列以外に、(P)の熱安定性が高まるアミノ酸配列、例えばシルクフィブロイン由来のGlyAla Gly Ala Gly Ser配列(9)を少なくとも2個有することが好ましく、このアミノ酸配列を3個以上有することがさらに好ましく、5～30個有することが特に好ましい。

【0025】ポリペプチド(P)としては、例えば、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)、配列(10)とArg Gly Asp配列とを有するポリペプチド、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)、配列(10)とTyr Ile Gly Ser Arg配列(2)とを有するポリペプチド、(Gly Ala Pro (Gly Pro Pro)₄)、配列(11)とArg Gly Asp配列とを有するポリペプチド、(Gly Ala Pro (Gly Pro Pro)₄)、配列

(11)とTyr Ile Gly Ser Arg配列(2)とを有するポリペプチド、及び(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)、配列(10)とIle Lys Val Ala Val配列(7)とを有するポリペプチド(特表平3-502935号公報)等が挙げられる。

【0026】ポリペプチド(P)として市場から入手できるものとしては、例えば、三洋化成工業(株)製プロネクチンF(遺伝子組替大腸菌により製造され、1分子中にArg Gly Asp配列と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)、配列(10)とを各々約13個有する数平均分子量約11万のポリペプチド)、同プロネクチンFプラス(プロネクチンFをジメチルアミノエチルクロライドと反応させて水溶性にしたもの)、同プロネクチンL(遺伝子組替大腸菌により製造され、1分子中にIle LysVal Ala Val配列(7)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)、配列(10)とを各々約7個有する数平均分子量約9万のポリペプチド)等が挙げられる。

【0027】また、宝酒造(株)製RetroNectin(リコンビナントヒトフィブロネクチンCH-296){ヒトフィブロネクチン細胞接着シグナルであるCS1シグナルと細胞接着ドメインType III及びヘパリン結合ドメインIIを1つずつ有する数平均分子量約6万のポリペプチド}(Leu Asp Val配列を約1個含有)、同RGDS-Protein A{Arg Gly Asp配列をProtein A(IgG結合ドメイン)に挿入した数平均分子量約3万のポリペプチド}(ArgGly Asp配列を約1個含有)もポリペプチド(P)として使用可能である。

【0028】ポリペプチド(P)の製造方法は特に制限されず、ペプチドを合成する従来既知の方法と同様に製造することができ、例えば、有機合成法(固相合成法、液相合成法等)及び生化学的合成法[遺伝子組換微生物(酵母、細菌、大腸菌等)]等によって合成することができる。有機合成法に関しては、例えば、日本生化学学会編「統生化学実験講座2、タンパク質の化学(下)」第641～694頁(昭和62年5月20日;株式会社東京化学同人発行)に記載されている方法等が用いられる。

【0029】生化学的合成法に関しては、例えば、特表平3-502935号公報に記載されている方法等が用いられる。高分子量の(P)を容易に合成できる点で、遺伝子組換微生物による生化学的合成法が好ましく、特に好ましくは遺伝子組換大腸菌を用いて合成する方法である。

【0030】本発明のビーズは、細胞接着シグナルを現す最小アミノ酸配列を1分子中に少なくとも1個有するポリペプチド(P)を、微粒子(B)の表面に、(B)の平均表面積1cm²当り、0.1～100μg含有しており、好ましくは0.2～50μg、さらに好ましくは0.3～10μgの範囲で含有している。すなわち、ポ

リペプチド(P)の含有量(μg)は、微粒子(B)の平均表面積 1cm^2 当り、0.1以上であり、好ましくは0.2以上、さらに好ましくは0.3以上であり、また、100以下であり、好ましくは50以下、さらに好ましくは10以下である。ポリペプチド(P)の含有量が、 $0.1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 未満である場合、(P)を含まない場合よりも細胞の接着・増殖性は高くなるものの、その効果は不十分であり、(P)の含有量が $100\mu\text{g}/\text{cm}^2$ を超える場合、効果は低下しないものの非経済的である。なお、(P)の含有量は、通常のタンパク量測定試薬(例えば、ピアスケミカル社製BCA蛋白試薬等)で測定することができる。微粒子(B)の平均表面積は、次のようにして求める。レーザー式粒度分布測定装置(例えば、商品名:LA-920(堀場製作所製)及びマルチタイザーIII(コールター社製)等)で、水を分散媒として(B)の体積平均粒子径 $[\phi(\mu\text{m})]$ を測定する。一方、比重の異なる液体(食塩水等)に、それぞれ微粒子(B)を加えて、(B)の浮遊する液を見いだすことにより、その液体の比重を(B)の比重(d)とする。そして、微粒子(B)の平均表面積は、(B)を真球状と擬制することにより、これらの体積平均粒子径(ϕ)及び比重(d)から、式 $\{ \text{表面積}(\text{cm}^2/\text{g}) = [4 \times \pi \times (\phi/2/10000)^2] / [4/3 \times \pi \times (\phi/2/10000)^3 \times d] \}$ から算出される。なお、鱗片状、棒状、直方体及び板状等の球状でないもの、表面に凹凸を有するもの(例えば凹凸の差が0.1mmを超えるもの)及び多孔質のもの(上記の方法では計算できないもの)は、比表面積計(例えば、QUANTASORB(ユアサアイオニクス製)を用いて測定(測定ガス;He/Kr=99.9/0.1体積比、検出ガス;窒素)することができる。なお、以上のすべての測定温度は25℃である。

【0031】本発明のビーズを得る方法としては、例えば、ポリペプチド(P)を溶媒に溶かした溶液を予め作製し、その中に微粒子(B)を加え、所定のコーティング時間必要に応じて攪拌した後に余分の溶液を捨て乾燥させるか、余分の溶液を捨てずに乾燥させる方法等が挙げられる。

【0032】ポリペプチド(P)の溶液を作製するために用いられる溶媒としては特に制限はないが、無機塩、有機酸塩、アミノ酸、ビタミン、アルコール、脂質・糖、酸及び/又は塩基を0.1~50重量%(好ましくは1~30重量%)含有する水溶液及び水等が使用できる。無機塩としては、ハロゲン化金属塩、硫酸金属塩、リン酸金属塩、硝酸金属塩、炭酸金属塩及び過ハロゲン酸金属等が使用でき、例えば、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、塩化カルシウム、硝酸鉄、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸水素カリウム、硫酸銅、硫酸鉄、塩化リチウム、臭化ナ

リウム、臭化リチウム過塩素酸ナトリウム及び過塩素酸リチウム等が挙げられる。

【0033】有機酸塩としては、例えば、鐵酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、酢酸リチウム及び酒石酸ナトリウム等が挙げられる。アミノ酸としては、例えば、アルギニン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、セリン及びグリシン等が挙げられる。ビタミンとしては、例えば、コリン、イノシトール、ニコチンアミド、グルタミン、ビタミンA及びビタミンB₁₂等が挙げられる。アルコールとしては、炭素数1~4のアルコール等が使用でき、例えば、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール及びブタノール等が挙げられる。

【0034】脂質・糖としては、例えば、脂質、単糖、2糖、オリゴ糖、アミノ糖及び酸性糖等が挙げられる。酸としては、無機酸及び炭素数1~6の有機酸等が使用でき、例えば、塩酸、硝酸、塩酸、硫酸、磷酸、酢酸、蟻酸、酒石酸、リンゴ酸、フェノール及びカテコール等が挙げられる。塩基としては、無機塩基及び炭素数2~6の有機塩基等が使用でき、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、モノエタノールアミン、トリエタノールアミン及びトリエチルアミン等が挙げられる。水としては、蒸留水、イオン交換水、水道水及びイオン交換蒸留水等が挙げられる。これらの溶媒の中で、無機塩、酸及び/又は塩基を含有する水溶液及び水が好ましく、さらに好ましくは無機塩を含有する水溶液及び水、特に好ましくは無機塩を含有する水溶液である。無機塩のうち、pH緩衝効果のある無機塩(炭酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸カリウム及びリン酸水素カリウム等)を含有するものが最も好ましい。

【0035】なお、好ましいpH範囲は、2~11.5であり、さらに好ましくは4~9.5、特に好ましくは6~8.5、最も好ましくは7~7.5である。すなわち、pHは、2以上が好ましく、さらに好ましくは4以上、特に好ましくは6以上、最も好ましくは7以上であり、また11.5以下が好ましく、さらに好ましくは9.5以下、特に好ましくは8.5以下、最も好ましくは7.5以下である。好ましい無機塩水溶液としては、pH7.2に調整されたリン酸水素ナトリウムとリン酸水素カリウムとの生理食塩水溶液[PBS(-)]等が挙げられる。ポリペプチド(P)がシルクフィブロイン由来のGly Ala Gly Ala Gly Ser配列(9)を含有する場合、その溶媒溶液の好ましい作成方法としては、該ポリペプチドを過塩素酸リチウムあるいは臭化リチウムに例えば1mg/mLの濃度にまず溶解し、PBS(-)で20~200倍に希釈する方法等が挙げられる。

【0036】ポリペプチド(P)の溶液の濃度は、溶媒

1ml当り、0.01 μ g~100mgが好ましく、さらに好ましくは0.1 μ g~10mg、特に好ましくは1 μ g~1mgである。すなわち、ポリペプチド(P)の溶液の濃度は、溶媒1ml当り、0.01 μ g以上が好ましく、さらに好ましくは0.1 μ g以上、特に好ましくは1 μ g以上であり、また100mg以下が好ましく、さらに好ましくは10mg以下、特に好ましくは1mg以下である。コーティング時間としては、用いる培養基材によっても異なるが、通常30秒~48時間、好ましくは1分~24時間、さらに好ましくは3分~12時間である。必要に応じて行われる乾燥の条件についても特に制限はなく、通常の方法が適用でき、例えば、必要に応じて順風乾燥機や減圧乾燥機などを用いて、0~200℃、0.001Pa~大気圧の圧力で、1~100時間乾燥することで行える。

【0037】また、必要に応じて行われる乾燥の前又は後で、無機塩を含有する水溶液又は水で通常の方法で洗浄することもできる。また、コーティングの後で、必要に応じて滅菌処理を施してもよい。滅菌方法は特に制限はなく、例えば、放射線滅菌、エチレンオキシドガス滅菌、オートクレーブ滅菌及び乾熱滅菌等が挙げられる。

【0038】本発明のビーズを用いて、培養される動物細胞の種類としては特に制限がなく、ヒト、サル、マウス、ハムスター、ラット及び昆虫等の初代培養細胞や株化細胞、並びに細胞培養実験、医薬品又はワクチン生産等に用いられる公知の細胞等が使用できる。具体的には例えば、Ver o (アフリカミドリザル腎)細胞、CHO (チャイニーズハムスター卵巣)細胞、WI38 (ヒト胎児肺)細胞、ヒト由来の幹細胞、内皮細胞、上皮細胞、実質細胞、線維芽細胞及び角質細胞等が挙げられる。これら細胞の中では、無血清培養のニーズが高く、本発明のビーズの特長が最大限活用される医薬品やワクチン生産用に用いられる細胞(Ver o細胞及びCHO細胞等)に最適である。

【0039】本発明のビーズを用いて動物細胞を培養する方法としては特に制限はなく、通常の方法、例えば、ビーズを培地とともに攪拌しながら細胞培養するいわゆる懸濁培養法、ビーズを流動層型バイオリアクター等の中に流動層として固定するかあるいはホローファイバー等の中に固定層として固定して培地を循環しながら細胞培養するいわゆる灌流培養灌流培養法等を用いることができる。本発明のビーズの使用量は、細胞の種類等によって異なるが、通常、培地1L当り、0.5~1000g、好ましくは1~100g、さらに好ましくは5~50gである。すなわち、本発明のビーズの使用量(g)は、培地1L当り、通常0.5以上、好ましくは1以上、さらに好ましくは5以上であり、また1000以下、好ましくは100以下、さらに好ましくは50以下である。

【0040】培地としては、用いる動物細胞の種類に応じて、MEM培地、BME培地、DME培地、 α MEM培地、IMEM培地、ES培地、DM-160培地、Fisher培地、F12培地、WE培地及びRPMI培地等、朝倉書店発行「日本組織培養学会編 組織培養の技術第三版」581頁に記載の基礎培地、これらの培地に血清成分(ウシ胎児血清等)等を添加したもの、並びに市販の無血清培地[味の素(株)製無血清培地ASF103、同ASF104、同ASF301、ギブコ社製無血清培地CHO-SFM、同VP-SFM等]等が用いられる。

【0041】血清培地を使用した場合、血清中に成分未知の蛋白質等が含まれ再現性が得られにくいこと、細胞を用いる医薬品生産の場合には精製工程が複雑となりコストがかかること、さらにウィルス感染の危険性があること等の理由から、血清を含まないいわゆる無血清培地が好ましく、特に、本発明のビーズは、無血清培地でも細胞の接着・増殖性に優れているため、本発明のビーズとともに用いる培地としては無血清培地が特に好ましい。

【0042】さらに必要に応じて、細胞増殖因子(S)を培地中に含有させることにより、動物細胞の増殖速度をさらに高めたり、細胞活性を高めたり、細胞が本来有する機能を発現させたりすることができる。細胞増殖因子(S)は細胞を増殖させる活性のある物質であり、例えば、FGF、VEGF、HGF、EGF、PDGF、IGF及びBMP等が挙げられ、この他に、例えば財団法人古屋大学出版会発行「上田実編ティッシュエンジニアリング(1999年)」43~51頁及び同文献に付記されている参考文献に記載されているもの等も用いられる。細胞増殖因子(S)を含有させる場合、この使用量(mg)としては、培地1L当たり、0.00001~100が好ましく、さらに好ましくは0.0001~10、特に好ましくは0.001~1である。すなわち、この場合、(S)の使用量(mg)は、培地1L当たり、0.00001以上が好ましく、さらに好ましくは0.0001以上、特に好ましくは0.001以上であり、また、100以下が好ましく、さらに好ましくは10以下、特に好ましくは1以下である。

【0043】培養条件としては、特に制限はなく、二酸化炭素(CO₂)濃度1~20体積%、5~45℃で1時間~100日間、必要に応じて1~7日毎に培地交換しながら培養すること等が挙げられる。特に好ましい例としては、例えば、CO₂濃度5体積%、37℃の条件で、2~4日毎に培地交換しながら1~36日間培養することである。

【0044】本発明のビーズは、動物細胞を効率的に接着・増殖させることができ、無血清培地を好適に使用できるため、細胞を用いる医薬品やワクチンの生産用に特に好適に使用できる。

【0045】

【実施例】以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

<実施例1>スチレン99重量%、ジビニルベンゼン1重量%を懸濁重合して得られたポリスチレンビーズを金属製網篩（JIS Z8801-1987）で篩い分け、75~106 μ mの間の粒子径を有するビーズを得た。レーザー式粒度分布測定装置LA-920（堀場製作所製）で測定した体積平均粒径は96 μ m、比重は1.05であった。このビーズの平均表面積は、上記の計算式によって595cm²/gと計算された。

【0046】特表平3-502935号公報中の実施例記載の方法に準じて、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)_n配列(10)とArg Gly Asp配列とを12個含むMn約11万の遺伝子組換え大腸菌の産生蛋白質“SLPF”を作製した。次いで、SLPFの4.5規定の過塩素酸リチウム水溶液（SLPFの濃度；1mg/ml）をリン酸バッファー液（PBS）でSLPFの濃度が15 μ g/mlとなるように希釈し、SLPF溶液1を作製した。

【0047】SLPF溶液1の25mlに上記で得られたビーズを5g加え、ポリフッ化エチレン樹脂（テフロン（登録商標））製攪拌子で12時間攪拌した。得られたビーズスラリーを振盪器上にセットしたステンレス製バットに移し、100℃の熱風を吹きつけながら、24時間振盪乾燥した。得られた乾燥ビーズをPBS50mlで2回洗浄し、PBS中で121℃で20分間オートクレーブ滅菌後、UV照射下に乾燥することで、本発明のビーズ1を得た。ビーズ1のSLPF含有量を、ビーズ1を4.5規定の過塩素酸リチウム溶液50mL中で24時間攪拌後、過塩素酸リチウム溶液上清中に溶出したSLPFの含有量をピアスケミカル社製BCA蛋白試薬で測定することによって求めた結果、0.1 μ g/cm²であった。

【0048】<実施例2>SLPF溶液1の代わりに、SLPFの濃度が45 μ g/mlのSLPF溶液2を用*

	実施例1	実施例2	実施例3	比較例1	比較例2	比較例3
ビーズ番号	1	2	3	4	5	6
細胞数 ($\times 10^6$ 個)	74	77	78	45	48	50
SLPF量 (μ g/cm ²)	0.1	0.3	0.7	0	0.03	0.06

なお、ビーズ1を用いて同様に、味の素（株）製無血清培地ASF104の代わりに、血清培地（FBS5%含有DMEM）を用いた場合の細胞数は、70 $\times 10^6$ 個であった。

【0055】この結果をSLPFの含有量を横軸にグラフ化すると、図1のようになる。図1から、SLPF含有量が0.1 μ g/cm²以上で、得られる細胞数が明

*いる以外は実施例1と同様にして、本発明のビーズ2を得た。ビーズ2のSLPF含有量は0.3 μ g/cm²であった。

【0049】<実施例3>SLPF溶液1の代わりに、SLPFの濃度が90 μ g/mlのSLPF溶液3を用いる以外は実施例1と同様にして、本発明のビーズ3を得た。ビーズ3のSLPF含有量は0.7 μ g/cm²であった。

【0050】<比較例1>SLPF溶液での処理を行わず、ポリスチレンビーズをそのまま用いて、比較用のビーズ4を得た。

【0051】<比較例2>SLPF溶液1の代わりに、SLPFの濃度が5.0 μ g/mlのSLPF溶液4を用いる以外は実施例1と同様にして、比較用のビーズ5を得た。ビーズ5のSLPF含有量は0.03 μ g/cm²であった。

【0052】<比較例3>SLPF溶液1の代わりに、SLPFの濃度が10.0 μ g/mlのSLPF溶液5を用いる以外は実施例1と同様にして、比較用のビーズ6を得た。ビーズ6のSLPF含有量は0.06 μ g/cm²であった。

【0053】<細胞培養>得られたビーズ1~6を用いて無血清細胞培養実験を行った。6個の1Lスピナーフラスコに、6gのビーズ1~6をそれぞれ加え、250mlの味の素（株）製無血清培地ASF104を加え、37℃で20分間攪拌下温調後、Verocell細胞[大日本製薬（株）から購入]を細胞濃度：5.0 $\times 10^6$ 個/mLに分散したもの5mlを加え、25rpmで攪拌しながら、二酸化炭素と空気の混合物（二酸化炭素/空気=5/95体積比）中、37℃で3日間培養を行なった。攪拌下ビーズ懸濁液をサンプリングし、細胞核数をウィーゼル（Wezel）によるクリスタルバイオレットを用いた細胞核計数法（nuclei-counting method）で計数することで、細胞数を測定した。結果を表1に示す。

【0054】

【表1】

らかに激増し、血清培地を用いた場合と同等以上の細胞数が得られることが判る。以上の実施例及び比較例から、本発明のビーズを用いた場合、無血清培養においても血清培地を使用した場合と同様に、細胞の増殖が促進されることが判る。

【0056】

【発明の効果】本発明のビーズを用いると、無血清でも

細胞を効率的に培養が可能であり、動物細胞を用いる医薬品やワクチンの生産の完全無血清化が実現できるものである。

【0057】

【図面の簡単な説明】

*【図1】SLPF量と細胞数との関係を表したグラフである。

【0058】

【配列表】

*

<110>三洋化成工業株式会社；SANYO CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

<120>動物細胞培養用ビーズ

<150>特願2001-322356

<151>2001-10-19

<160>11

<210>1

<211>4

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>1

Arg Glu Asp Val

1

<210>2

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>2

Tyr Ile Gly Ser Arg

1

5

<210>3

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>3

Pro Asp Ser Gly Arg

1

5

<210>4

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>4

Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg

1

5

<210>5

<211>6

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>5

Leu Gly Thr Ile Pro Gly

1

5

<210>6

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

17

18

<400>6

Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile

1 5 10

<210>7

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>7

Ile Lys Val Ala Val

1 5

<210>8

<211>4

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>8

Asp Gly Glu Ala

1

<210>9

<211>6

<212>PRT

<213>Bombyx mori

<400>9

Gly Ala Gly Ala Gly Ser

1 5

<210>10

<211>54

<212>PRT

<213>Bombyx mori

<400>10

Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala

1 5 10 15

Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala

20 25 30

Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser

35 40 45

Gly Ala Gly Ala Gly Ser

50

<210>11

<211>30

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>11

Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly

1 5 10 15

Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro

20 25 30

【図1】

